

CA

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C12Q 1/06 C12P 19/34



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03116961.9

[43] 公开日 2003 年 9 月 17 日

[11] 公开号 CN 1442488A

[22] 申请日 2003.5.16 [21] 申请号 03116961.9

[71] 申请人 上海晶泰生物技术有限公司

地址 200233 上海市桂平路 69 号 25 号楼 6 楼

[72] 发明人 张 涛 李 宾 彭永济 王 东
王 燕 高 雨 孙 露

[74] 专利代理机构 上海东亚专利代理有限公司

代理人 董 梅

权利要求书 3 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称 传染性非典型肺炎 (SARS) 病毒复合荧光定量 PCR 检测

[57] 摘要

本发明 SARS 病毒复合荧光定量 PCR 检测涉及一种定量 PCR 检测方法, 根据 SARS 病毒基因组不同区域的序列或不同 SARS 病毒变异株序列设计 PCR 引物和荧光探针, 不同的探针采用不同的荧光进行标记; 以 SARS 病毒 RNA 的反转录产物作为模板, 进行 PCR 扩增; 扩增过程中收集反应管中不同的荧光信号, 根据荧光信号的变化情况, 测定样品中 SARS 病毒的类型和含量。具有仅仅通过一次反应即可检测多个不同的 SARS 病毒片段或不同的 SARS 病毒变异株, 同时可对扩增片段进行定量分析的特点。检测体系灵敏度和特异性高, 检测结果准确可靠, 而且减少了操作步骤, 降低了检测成本, 实用性强。

ISSN 1008-4274

1. SARS 病毒复合检测, 根据 SARS 病毒基因组不同区域的序列或不同病毒株序列设计 PCR 引物和探针, 对取得的样品进行扩增, 其特征在于以 SARS 病毒 RNA 的反转录产物作为模板, 进行 PCR 反应, 在同一个反应体系中扩增多个 SARS 病毒目标片段, 采用不同的荧光对不同的探针进行标记, 通过检测 PCR 反应体系中不同荧光信号的变化, 确定患者是否感染 SARS 病毒, 以及 SARS 病毒的类型和含量。
2. 根据权利要求 1 所述的 SARS 病毒复合荧光定量检测, 其特征在于, 所述用于复合检测的荧光探针可以是双标记探针 (double-labeled probe)、分子信标 (molecular beacon)、能量传递荧光探针 (Fluorescent resonance energy transfer) 中的一种或一种以上, 用于标记探针的荧光可以是 FAM、TET、JOE、VIC、HEX、ROX、TAMRA、CY3、CY3.5、CY5、CY5.5、Oregon Green™、CAL Red™、Red 640、Texas Red 中的二种或二种以上, 所述提取的样品为患者血清、唾液、嗽口液、排泻物中的一种。
3. 根据权利要求 1、2 所述的 SARS 病毒复合荧光定量检测, 其特征在于, 采用两步法进行 SARS 病毒复合荧光定量检测: 在反转录酶的作用下, 将 SARS 病毒 RNA 转变为 cDNA; 再以 cDNA 为模板, 在 DNA 聚合酶的作用下扩增 SARS 病毒特异片段。

03116961.9

权 利 要 求 书 第2/3页

4. 根据权利要求 1、2 所述的 SARS 病毒复合荧光定量检测，其特征在于，采用一步法进行 SARS 病毒的检测，使反转录和 PCR 扩增在同一反应管中进行。
5. 根据权利要求 1、2 所述的 SARS 病毒复合荧光定量检测，其特征在于，第一，根据 SARS 病毒基因组序列设计三套特异性引物和荧光探针，分别扩增 SARS 病毒的复制酶/聚合酶(Replicase/Polymerase)基因片段、衣壳蛋白(Capsid)基因片段和囊膜蛋白(Envelope)基因片段，三个探针分别用不同的荧光进行标记；第二，SARS 病毒反转录和 PCR 扩增：在 20 μ l 反应体系中，包含特异性引物各 0.4 μ M、荧光探针各 0.2 μ M、0.25mM dNTP、3.5mM MgCl₂、10 个单位的反转录酶和 1 个单位的热启动 Taq DNA 聚合酶，反应条件：反转录 42 $^{\circ}$ C 温浴 20 分钟、激活聚合酶 95 $^{\circ}$ C 温浴 10 分钟、PCR 扩增在 95 $^{\circ}$ C 保温 10 秒，55 $^{\circ}$ C 保温 15 秒，72 $^{\circ}$ C 保温 15 秒，共进行 45 个循环；第三，荧光信号的收集：反转录和 PCR 扩增是在荧光定量 PCR 仪中进行，在每一个循环的 72 $^{\circ}$ C 保温结束后，收集反应管中三种不同的荧光信号，根据各种荧光信号的变化情况，确定检测样品中是否存在 SARS 病毒，以及病毒的类型和含量。
6. 根据权利要求 1、2 所述的 SARS 病毒复合荧光定量检测，其特征在于，第一，根据 SARS 病毒不同变异株的基因组序列设计三套特异性引物和荧光探针，分别扩增三个不同变异株所特有的基因片段，三

个探针分别用不同的荧光进行标记；第二，提取样品中的病毒 RNA，所述样品可以是患者血清、唾液、嗽口液、排泻物中的一种，对 SARS 病毒反转录和 PCR 扩增：在 20 μ l 反应体系中，包含特异性引物各 0.4 μ M、荧光探针各 0.2 μ M、0.25mM dNTP、3.5mM MgCl₂、10 个单位的反转录酶和 1 个单位的热启动 Taq DNA 聚合酶，反应条件如下：反转录在 42 $^{\circ}$ C 温浴 20 分钟、激活聚合酶在 95 $^{\circ}$ C 温浴 10 分钟、PCR 扩增在 95 $^{\circ}$ C 保温 10 秒，55 $^{\circ}$ C 保温 15 秒，72 $^{\circ}$ C 保温 15 秒，共进行 45 个循环；第三，荧光信号的收集：反转录和 PCR 扩增是在荧光定量 PCR 仪中进行，在每一个循环的 72 $^{\circ}$ C 保温结束后，收集反应管中三种不同的荧光信号，根据各种荧光信号的变化情况，确定检测样品中 SARS 病毒变异株的类型和含量。

传染性非典型肺炎 (SARS) 病毒复合荧光定量 PCR 检测

技术领域

本发明传染性非典型肺炎 (SARS) 病毒复合荧光定量 PCR 检测涉及一种定量 PCR 检测方法, 属于生命科学领域。荧光定量 PCR 是通过实时监控 PCR 体系中的荧光信号, 对样本中初始模板进行定量分析的一项新技术。可用于生物学、医学及其相关领域。

背景技术

传染性非典型肺炎是一种急性的呼吸系统感染, 世界卫生组织 (WHO) 于 2003 年 3 月 15 日将其命名为严重急性呼吸道症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome), 简称为 SARS。传染性非典型肺炎主要通过近距离空气飞沫和密切接触传播, 有很强的传染性。世界卫生组织于 2003 年 4 月 16 日正式确认冠状病毒的一个变种是引起此次传染性非典型肺炎的病原体。冠状病毒可感染人和家禽家畜, 可引起家禽的传染性支气管炎, 鼠肝炎, 猪脑脊髓炎, 猫传染性腹膜炎等; 人冠状病毒可引起上呼吸道感染, 婴幼儿哮喘及细支气管炎, 急性胃肠炎。迄今为止, 对 SARS 病毒多个病毒株的全基因组测序已经完成, 为设计有效的病毒检测方法提供了可能。

目前用于 SARS 病毒检测的方法主要有两种：酶联免疫法检测和 PCR 检测。SARS 病毒 IgM/IgG 抗体特异性酶联免疫法以灭活病毒作为抗原，对病人进行血清学检测，具有较高特异性。但由于检测的目标是患者血清中的抗体，而患者从感染病毒到体内生成抗体需要较长的时间，所以该方法通常只能检测出感染病毒时间较长的患者。SARS 病毒携带者有一定时间的潜伏期（通常为 4—15 天），对于潜伏期的患者，采用酶联免疫法检测的效果不佳。因为潜伏期患者同样具有传染性，所以提高潜伏期患者的检测率对控制疫情十分重要。

SARS 病毒的 PCR 检测是根据 SARS 病毒基因组序列设计一对引物，通过变性、退火、延伸三个循环步骤，可使目标 DNA 片段呈指数扩增，产物经琼脂糖电泳，即可出现相应的阳性条带。PCR 系统是一个极其灵敏的信号放大系统，能将极微弱的基因信号检测出来。相对于酶联免疫法而言，PCR 检测的灵敏度明显加强。但由于引物复性过程中可能出现碱基错配，结果会导致非特异性片段的扩增，同时抑制了 SARS 病毒目标片段的有效扩增，最终导致出现假阴性结果。另外，随着研究的深入，发现 SARS 病毒具有很高的变异能力，如果对应于 PCR 引物位置的核苷酸发生了突变，将直接导致引物不能和模板结合，扩增反应不能进行。据统计，目前应用的 SARS 病毒 PCR 检测法的检出率只有 70% 左右，灵敏性还有待进一步的提高。

研究表明，不同的 SARS 病毒变异株在毒性和传染性上存在差异，所以确定患者所感染病毒株的类型对临床治疗极为重要，这是目

前的酶联免疫检测和 PCR 检测无法完成的。另外，常规的 PCR 方法不能测定起始样本中 SARS 病毒的含量水平，所以不能反映患病的严重程度，也不能反映治疗的效果，从而限制了它在临床检测中的应用。

发明内容

本发明的目的在于提供一种可同时检测 SARS 病毒多个片段或不同病毒变异株的复合荧光定量 PCR 检测方法。

本发明目的可通过以下技术方案实现：根据 SARS 病毒基因组序列设计特异性引物和荧光探针，不同的探针采用不同的荧光进行标记；抽取患者样本中的病毒 RNA，并反转录成 cDNA；以 SARS 病毒 cDNA 为模板，以病毒特异性引物进行 PCR 扩增，通过检测反应体系中探针荧光信号的变化，测定样本中 SARS 病毒的变异类型及含量。特点是：在一个 PCR 反应体系中，包含多组 SARS 病毒引物和荧光探针，可同时检测 SARS 病毒的不同区段或不同的病毒变异株。

本发明利用荧光定量 PCR 技术，即是指通过实时监控 PCR 体系中的荧光信号，对样本中初始模板进行定量分析。定量 PCR 可实时检测产物量，通过加入已知浓度的标准样品绘制标准曲线，然后根据待测样品在标准曲线中的位置推算初始模板的浓度。它操作简便，结果准确可靠，是一种新的临床检测方法。不但可以检测出患 SARS 病毒株的类型，而且可以确定病毒的含量。

在上述技术方案的基础上, 扩增片段位于 SARS 病毒基因组的不同位置, 用于 PCR 扩增的引物和探针是根据 SARS 病毒基因组序列的不同区段而设计的, 如附图 1 所示。荧光定量 PCR 的前提是 PCR 引物和荧光探针都和模板特异结合, 从而大大提高了检测的特异性。当其中一个片段发生变异, 导致不能正常扩增时, 其它片段仍可以正常扩增, 从而避免出现假阴性结果, 提高了检出率。

扩增片段也可位于 SARS 病毒基因组的同一位置, 但引物和探针是根据不同的病毒变异株序列而设计的, 如附图 2 所示。不同的引物和探针组合扩增来自不同病毒变异株的相应片段, 从而检测患者携带 SARS 病毒的类型及病毒数量。

在上述技术方案的基础上, 用于复合检测的荧光探针可以是双标记探针 (double-labeled probe)、分子信标 (molecular beacon)、能量传递荧光探针 (Fluorescent resonance energy transfer) 等中的一种或一种以上, 用于标记探针的荧光可以是 FAM、TET、JOE、VIC、HEX、ROX、TAMRA、CY3、CY3.5、CY5、CY5.5、Oregon Green™、CAL Red™、Red 640、Texas Red 等中的二种或二种以上。

在上述技术方案的基础上, SARS 病毒复合荧光定量 PCR 检测可采用两步法进行: 在反转录酶的作用下, 将 SARS 病毒 RNA 转变为 cDNA; 以 cDNA 为模板, 在 DNA 聚合酶的作用下扩增 SARS

病毒特异片段。也可以采用一步法进行 SARS 病毒的检测：反转录和 PCR 扩增在同一反应管中进行。

在上述技术方案的基础上，用于 SARS 病毒 RNA 抽提的样本可以是患者血清、唾液、嗽口液及排泄物等。

本发明 SARS 病毒复合荧光定量 PCR 检测方法如下：第一步，根据待扩增的片段，设计 PCR 引物和探针，不同的探针采用不同的荧光进行标记；第二步，提取样品中的病毒 RNA，并反转录成为 cDNA；第三步，在荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增，同时收集反应管中不同的荧光信号；第四步，通过荧光信号的变化情况，确定 SARS 病毒的类型及含量。

本发明具有下述优越性：第一，在一个反应体系中同时检测多个不同位置的 SARS 病毒基因片段，其中任何一个片段正常扩增，即可确定为 SARS 患者，从而大大提高临床检测的速度和检出率，减少假阴性；第二、多个片段同时扩增的方法降低了对引物和探针设计的要求，即使非专业人员也很容易设计出满足检测要求的引物和探针组合。第三，根据不同的 SARS 病毒株设计不同的引物和探针组合，能对 SARS 病毒进行快速分型，指导临床治疗。第四，可对 SARS 病毒进行定量测定。通过测定反应体系中不同荧光信号的变化，可以准确反映出患者 SARS 病毒的携带量，以及病毒的类型，为临床治疗提供科学依据。第五，灵敏度高。荧光定量 PCR 技术通过对反应体系中

的荧光信号进行实时监控,大大提高了检测的灵敏性,反应体系中即使只存在目标片段的单个拷贝,也能得到有效的扩增与检测。第六,特异性高,检测结果可靠。第七,多个片段的复合检测不仅效率高,而且减少了操作步骤,降低了检测成本,实用性强。

附图说明

附图 1: 复合荧光定量 PCR 检测 SARS 病毒的不同区域

附图 2: 复合荧光定量 PCR 检测不同的 SARS 病毒变异株

→ 正向引物

← 反向引物

—•— •—• —+— 荧光探针

具体实施方式

实施方式一:

根据 SARS 病毒基因组序列设计三套特异性引物和荧光探针,分别扩增 SARS 病毒的复制酶/聚合酶(Replicase/Polymerase)基因片段、衣壳蛋白(Capsid)基因片段和囊膜蛋白(Envelope)基因片段。三个探针分别用不同的荧光进行标记。

提取样品中的病毒 RNA,样品可以是患者血清、唾液、嗽口液、排泄物等。

SARS 病毒反转录和 PCR 扩增：在 20 μ l 反应体系中，包含特异性引物各 0.4 μ M、荧光探针各 0.2 μ M、0.25mM dNTP、3.5mM MgCl₂、10 个单位的反转录酶和 1 个单位的热启动 Taq DNA 聚合酶。反应条件如下：

反转录： 42 $^{\circ}$ C 温浴 20 分钟，

激活聚合酶：95 $^{\circ}$ C 温浴 10 分钟

PCR 扩增： 95 $^{\circ}$ C 保温 10 秒，55 $^{\circ}$ C 保温 15 秒，72 $^{\circ}$ C 保温 15 秒，共进行 45 个循环。

荧光信号的收集：反转录和 PCR 扩增是在荧光定量 PCR 仪中进行，在每一个循环的 72 $^{\circ}$ C 保温结束后，收集反应管中三种不同的荧光信号。根据各种荧光信号的变化情况，确定检测样品中 SARS 病毒的类型和含量。

实施方式二：

根据 SARS 病毒不同变异株的基因组序列设计三套特异性引物和荧光探针，分别扩增三个不同变异株所特有的基因片段。三个探针分别用不同的荧光进行标记。

提取样品中的病毒 RNA，样品可以是患者血清、唾液、嗽口液、排泄物等。

SARS 病毒反转录和 PCR 扩增：在 20 μ l 反应体系中，包含特异性引物各 0.4 μ M、荧光探针各 0.2 μ M、0.25mM dNTP、3.5mM MgCl₂、

03116961.9

说明书 第8/8页

10 个单位的反转录酶和 1 个单位的热启动 Taq DNA 聚合酶。反应条件如下:

反转录: 42°C 温浴 20 分钟,

激活聚合酶: 95°C 温浴 10 分钟

PCR 扩增: 95°C 保温 10 秒, 55°C 保温 15 秒, 72°C 保温 15 秒,
共进行 45 个循环。

荧光信号的收集: 反转录和 PCR 扩增是在荧光定量 PCR 仪中进行, 在每一个循环的 72°C 保温结束后, 收集反应管中三种不同的荧光信号。根据各种荧光信号的变化情况, 确定检测样品中 SARS 病毒变异株的类型和含量。

03116961.9

说明书附图

第1/1页

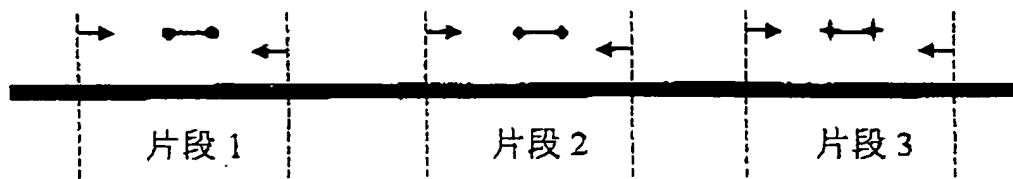


图 1

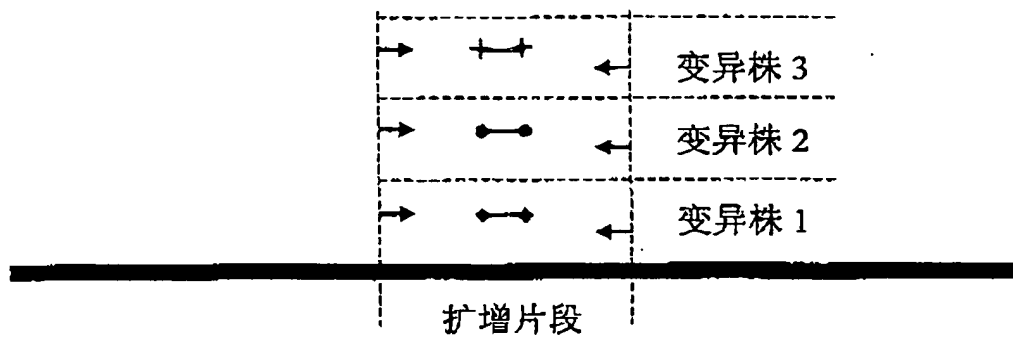


图 2